

血小板機能に着目した糖尿病からアルツハイマー型認知症の発症に至る機序の解明
(19-21)

主任研究者 徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 臨床検査部 (部長)

研究要旨

糖尿病(DM)はアルツハイマー型認知症(AD)の危険因子としてよく知られているが、その機序は未だ判然としていない。本研究はDM患者由来の血小板を用いて、その機能における amyloid β -peptide (A β)の作用を検討し、詳細な臨床情報と統合的に解析することにより、DMからAD発症にいたる機序の一端を解明することを目的としている。また、バイオバンクに登録されたDMに併発するADに由来する患者情報とその試料を解析し、機序解明の一助とする。55歳以上のDM患者より早朝空腹時に静脈血を採取し多血小板血漿を調整し、A β を作用させた後、トロンビン受容体を刺激し血小板凝集能を検討した。2021年3月末までに99例を検討した。A β の作用は事例によって相違しており、減弱を示したもの(減弱群:I群)が39例、不変であったもの(不変群:II群)が38例、増強を示したもの(増強群:III群)が17例であった。抗血小板薬使用例においても増強を示すものが10例認められた。MRIにおける大脳白質病変(WMH)について、83例(不適切例10例を除く)のSNIPPERによる解析を実施し、白質病変を示すLES/ICは $0.621 \pm 0.870\%$ を、萎縮を示すPAR/ICは $79.4 \pm 5.5\%$ を示した。3群間においてMRIにおける海馬萎縮の指標であるVSRAD値を比較検討したところ、I群, 0.865 ± 0.369 ; II群, 0.935 ± 0.467 ; III群, 0.636 ± 0.291 と、III群において有意な低値を認めしたが、PAR/ICではこの傾向は明らかでなかった。さらに症例を重ねるとともに、血小板より分泌・遊離される生理的活性化物質および刺激時に活性化される細胞内情報伝達系の変化を検討することとしている。健常人由来の血小板を用いた検討では、骨髄において造血機構に重要な役割を果たしているケモカインのCXCL12に着目し、それぞれ単独では血小板に対してほとんど作用を示さない低用量のコラーゲンと低用量CXCL12による同時刺激が、受容体としてそれぞれGPVIとCXCR4を介して相乗的に作用し、p38 mitogen-activated protein kinaseの活性化を介して血小板凝集を促進すること、また、それに伴ってPDGF-AB分泌、sCD40L遊離、HSP27のリン酸化およびリン酸化HSP27の遊離を刺激することを明らかとした。高齢期の慢性炎症状態における血栓形成の機序の一つとして注目すべき知見である。

主任研究者

徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 臨床検査部 (部長)

分担研究者

櫻井 孝 国立長寿医療研究センター もの忘れセンター (センター長)

小澤 修 岐阜大学大学院医学系研究科 (教授)

A. 研究目的

私共はこれまでに DM 患者における血小板機能を解析し、低用量 ADP 刺激時の血小板凝集亢進における P2Y12 受容体を介するシグナルの役割、コラーゲン刺激時の血小板凝集における p38 MAP キナーゼの役割、ADP 刺激時の低分子量ストレス蛋白質 HSP27 のリン酸化と凝集能亢進との関連性、コラーゲン刺激、トロンビン刺激およびリストセチン刺激による血小板由来細胞増殖因子(PDGF)分泌に共役したリン酸化 HSP27 の細胞外への遊離等の新しい知見を明らかとし、血小板凝集における ADP およびコラーゲンの ED₅₀ 値を抗血小板薬有効性の指標として確立した。また、睡眠時無呼吸症候群患者由来の血小板において、正常では見られない Akt 活性の亢進に伴うリン酸化 HSP27 の遊離が観察されるが、DM 患者よりそのレベルは低いことを示した。一方、AD の病態として、Aβの脳内での蓄積がよく知られているが、Aβの前駆物質である amyloid 前駆体タンパク質は血小板の α granule に豊富に含まれ、血液中の Aβ の大部分が血小板由来であることから、血小板は AD における新たな治療戦略上の標的として注目されている(Inyushin et al., Biomed. Res. Int. 2017;2017:3948360)。ごく最近私共は、健常者由来の血小板においてトロンビン刺激による反応性が Aβにより修飾されることを見出した(未発表データ)。DM 患者は AD の発症頻度が高いことがよく知られているが、リスクに関与する機序については未だ解明されておらず、Aβの血小板活性化に対する修飾作用は DM における AD 発症リスクの一つである可能性がある。本研究では、これらの知見を踏まえ、DM 患者における血小板機能の Aβによる修飾を解析し、MRI をはじめ詳細な臨床情報と統合的に分析する。また、もの忘れセンターからバイオバンクに登録された DM に併発する AD 由来の患者情報および臨床検体を収集し、加えて血小板からのリン酸化 HSP27 等の新しいバイオマーカーの遊離の変化を分析する。以上の詳細な解析により DM から AD に至る機序の一端を血小板機能から明らかとし、DM 患者における AD ハイリスク群の選別方法の提示など、AD 発症予防に対する有効な検査法・治療法の開発の一助とすることを目的としている。本研究は、私共の知見を AD の危険因子としての DM という観点から発展させるものであり、極めて独創性が高い。Aβが血小板凝集能を修飾するとの報告はあるが、その臨床的意義に関する検討は十分ではなく、質の高いバイオバンク試料・情報を活用する本研究は極めて有意義と考えられる。

B. 研究方法

血小板機能の解析

1)対象

55歳以上のDM患者を解析の対象とした。また、岐阜大学における血小板機能制御機構の解析では、健常成人を被験者とした。

2)血小板血漿の調整

被験者の肘静脈等より静脈血約10 mlをクエン酸加条件に採取し、多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) および乏血小板血漿 (platelet-poor plasma: PPP) を分離調整した。

3)血小板凝集能の解析

PRPをAβにて前処置したのち、トロンビンで刺激し、レーザー光スキャタリング法 (LS法) に基づく測定装置 (PA-200:興和) を用いて血小板凝集能の変化を解析した。LS法では透過光遮蔽率 (Trans %) の他に、血小板凝集塊の大きさにより、微小凝集塊 (small, 25 μm 未満)、中凝集塊 (medium, 25-50 μm) および大凝集塊 (large, 50-75 μm) が識別、表示できる。これらの刺激時 AUC を数量化し、解析に用いた。反応停止後の PRP を 20,000 × g にて 2 分間遠心分離し、沈査を細胞画分とし SDS にて可溶化するとともに、上清を -30 度で保管し、細胞レベルでの解析に供した。

4)臨床情報の収集

年齢、性別、身長、体重、血圧、DM 罹病期間、治療期間、治療内容、網膜症の有無および病期、認知機能 (MMSE)、服用中の薬剤名、白血球数、赤血球数、血色素値、血小板数、総蛋白、アルブミン、AST、ALT、ALP、γ-GTP、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、クレアチニン、eGFR、シスタチン C、血糖、HbA1c、尿蛋白、尿中アルブミン値、頭部 MRI 所見を収集した。

5)頭部 MRI 画像における大脳白質病変および脳萎縮の解析

2019年12月までに脳MRIを実施したDM患者38名において、コンピューターによる容積分析 (SNIPPER) を実施した。

6)血小板細胞レベルでの解析

可溶化した細胞画分中の機能性蛋白質のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。リン酸化レベルは image J ver. 1.32 を用いて数値化し解析した。反応上清中の PDGF-AB 濃度およびリン酸化 HSP27 濃度を ELISA 法にて測定し、これらの血小板刺激時の分泌・遊離につき検討した。

7)統計学的解析

統計学的解析には SPSS ver. 19.0 (IBM SPSS Statistic Inc.) を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、「ヘルシンキ宣言」ならびに「人を対象とする医学系研

究に関する倫理指針」を遵守するものとし、研究計画は国立長寿医療研究センター倫理審査委員会および岐阜大学医学系研究科医学研究等倫理審査委員会において承認を得た。検体収集に当たっては委員会で承認された説明文書、患者同意書の書式を用いて患者へのインフォームドコンセントを行い、患者の自由意思に基づく同意を得て血液試料を得るとともに、匿名化の上で解析に用いることとしており、供給された試料は倫理委員会による規定にそって、鍵のかかる冷凍庫に保管するなどの適切な処置を行うこととした。

C. 研究結果

1) 血小板機能とSNIPER法による解析

2021年3月末までに99例のDM患者(1型：8例；2型：91例)について、Laser Scattering法による血小板凝集解析を行った。ADP刺激時のED₅₀値(註：健常者の範囲 1.534-2.022 μM)より亢進とされたものは38例、抑制とされたものは45例であった。(2件測定不能)なお抗血小板薬の投与は30例で、うち21例が抑制を、不変が6例を示し、亢進例は3例であった。これらにおいて、引き続きトロンビン刺激時の血小板凝集に対するAβの作用を検討した。その結果、トロンビン刺激時の血小板凝集に対するAβの作用は事例により相違を示すことが判明したため、Aβ処置がトロンビン刺激による透過光量(AUC)の増加分(Δ)に与えた変化を変化率： $\Delta A\beta(+)/\Delta A\beta(-) \times 100(\%)$ として半定量化し、<90%を減弱群、90~110%を不変群、>110%を増強群とした。減弱群が39例、不変群が38例、増強群が17例であった。ADP ED₅₀値はそれぞれ1.990 ± 0.912 μM、1.544 ± 0.925 μM、1.386 ± 0.819 μMであり、増強群と減弱群の間にp=0.026、不変群と減弱群にp=0.038の統計学的有意差を認めた。なお、抗血小板薬投与例では減弱群15例、不変群9例、増強群5例であった。

2021年2月末までに、93例のMRI所見を収集し、WMHと萎縮について、SNIPERを用いて分析した。10例は解析に不適切とされた。WMHを示すLES/ICは0.621 ± 0.955%、萎縮を示すPAR/ICは79.4 ± 5.5%であった。

2) トロンビン刺激に対するAβの反応性の相違による層別化解析

2021年2月末までの結果を用いて、減弱群(I群)、不変群(II群)および増強群(III群)の3群に層別化し、収集した臨床情報を比較解析した。年齢はI群、75.8 ± 7.4歳；II群、75.8 ± 6.3歳；III群、71.9 ± 7.1歳と有意差を認めなかった。血糖コントロールの指標であるHbA1c値はI群、9.0 ± 1.9%；II群、8.6 ± 1.7%；III群、9.1 ± 2.2%であり、有意差を認めなかった。その他、血圧、血小板数、中性脂肪値、コレステロール値に有意差を認めなかった。一方、MRIにおける海馬萎縮の指標であるVSRAD値は、I群、0.865 ± 0.369；II群、0.935 ± 0.467；III群、0.636 ±

0.291であった。群間の比較ではI群 vs II群, $p=0.515$; I群 vs III群, $p=0.036$; II群 vs III群, $p=0.009$ とI群とIII群、II群とIII群の間に有意差を認めた。なお、SNIPPERによるLES/ICはI群, $0.717 \pm 0.907\%$; II群, $0.622 \pm 0.694\%$; III群, $0.383 \pm 0.619\%$ で各群間に有意差を認めなかった。一方、PAR/ICはI群, $80.7 \pm 3.8\%$; II群, $77.8 \pm 5.0\%$; III群, $80.4 \pm 3.8\%$ でI群とII群の間に有意差($p=0.025$)を認めた。

3) 血漿Dダイマーの解析

トロンビン刺激前の残余検体を用いて血漿Dダイマーの解析を行った。2020年3月末までに収集した66例を測定に供した。トロンビン刺激に対するA β の反応性で層別化した3群においてI群, $0.980 \pm 0.963 \mu\text{g/ml}$; II群, $0.751 \pm 0.510 \mu\text{g/ml}$; III群, $0.544 \pm 0.519 \mu\text{g/ml}$ と、有意差を認めなかった。一方、Dダイマーの値が $<1 \mu\text{g/ml}$ を示した正常群と、 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ を示した高値群に分類して比較解析したところ、HbA1c値は正常群, $8.46 \pm 1.84\%$; 高値群, $9.19 \pm 1.91\%$ ($p=0.201$)と2群間で有意差を認めなかったが、eGFR値は、正常群, $71.0 \pm 18.6 \text{ ml/min/m}^2$; 高値群, $52.6 \pm 13.1 \text{ ml/min/m}^2$ ($p=0.001$)、u-Alb値は正常群, $24.4 \pm 47.3 \text{ mg/gcr}$; 高値群, $171.1 \pm 235.7 \text{ mg/gcr}$ ($p<0.001$)、VSRAD値は正常群, 0.820 ± 0.387 ; 高値群, 1.141 ± 0.412 ($p=0.008$)と2群間に有意差を認めた。

4) 血小板機能の細胞レベルでの解析

健常者由来の血小板を用いて、CXCファミリーに分類されるケモカインのうちCXCL12に着目し、低用量コラーゲンによるヒト血小板作用に対するCXCL12の影響を明らかにすることを目的とし、以下の結果を得た。コラーゲン ($0.2 \mu\text{g/ml}$) あるいはコンバルキシン (20 ng/ml) とCXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独では、ほとんど血小板凝集を促進しなかったが、同時刺激によって有意に血小板凝集を促進した。コラーゲン ($0.2 \mu\text{g/ml}$) とCXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激によって促進された血小板凝集はCXCR4中和抗体によって有意に抑制された。コラーゲン ($0.05\text{-}0.3 \mu\text{g/ml}$) とCXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独ではPDGF-AB分泌とsCD40L遊離を促進しなかったが、同時刺激によって有意にPDGF-AB分泌およびsCD40L遊離を促進するとともに、p44/p42 MAPKではなくp38 MAPKのリン酸化を促進した。p38 MAPKの阻害薬であるSB203580は、コラーゲン ($0.1\text{-}0.3 \mu\text{g/ml}$) とCXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激によって促進された血小板凝集、p38 MAPKのリン酸化、PDGF-AB分泌およびsCD40L遊離を有意に抑制した。コラーゲン ($0.4 \mu\text{g/ml}$) とCXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独ではHSP27のリン酸化を促進しなかったが、同時刺激によってHSP27のリン酸化を促進し、SB203580は、コラーゲン ($0.1\text{-}0.2 \mu\text{g/ml}$) とCXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激によって促進されたHSP27のリン酸化およびリン酸化HSP27遊離を有意に抑制した。

D. 考察と結論

前年度の解析により、DM患者由来の血小板におけるトロンビン刺激時の血小板凝集能に対するA β の影響には、増強、不変および減弱のいずれも見られることが示された。この結果、すなわち、A β に対する血小板の反応には多様性が見られることを踏まえ、今年度はさらに症例を重ねることにより、層別化を図ることを目標としていたが、コロナ禍による患者数の減少が影響し、想定を下回る分析数となった。限定された症例数の中であるが、海馬萎縮の指標であるVSRAD値が、亢進群において不変または減弱群より低値を呈したことは、A β に対する増強反応が海馬萎縮に抑制的に働く可能性を示唆する知見と考えられ、重要な成果である。この傾向はSNIPER法によるPAR/IC分析では示されなかったが、特に亢進群についての症例数を増やす必要があると考える。一方、血漿Dダイマーレベルが有意に高い事例が存在することが明らかとなった。A β に対する反応性との関連は見られなかったが、Dダイマー高値を示す群では、糖尿病性腎症の指標である尿中Albが高く腎血流量の指標であるeGFRが低いこと、およびVSRAD値が高いことが示された。HbA1cとは関連がなかったが、Dダイマーの高値は、腎症および海馬萎縮のマーカーとなる可能性が示された。新たな検討課題として、今後バイオバンク試料を用いた解析につなげてゆきたいと考えている。

骨髄において造血機構に重要な役割を果たしていると考えられているケモカインのCXCL12に着目し、健常者由来の成熟血小板において、それぞれ単独では血小板に対してほとんど作用を示さない低用量のコラーゲンと低用量CXCL12による同時刺激が、受容体としてそれぞれGPVIとCXCR4を介して相乗的に作用し、p38 MAPKの活性化を介して血小板凝集を促進すること、また、それに伴ってPDGF-AB分泌、sCD40L遊離、HSP27のリン酸化およびリン酸化HSP27の遊離を刺激することを明らかとした。このことは、糖尿病をはじめとする高齢期の慢性炎症状態における血栓形成の機序の一つとして注目すべき知見である。さらに、検討を進め、DMにおけるアルツハイマー型認知症の予防に資する生理的活性化物質の探求を遂行する所存である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onuma T, Iida M, Kito Y, Tanabe K, Kojima A, Nagase K, Uematsu K, Enomoto Y, Doi T, Tokuda H, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Iida H. Cigarette smoking cessation temporarily enhances the release of phosphorylated-HSP27 from human platelets. *Intern. Med.* 2020;59(15):1841-1847.
- 2) Kim W, Tanabe K, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Tachi J, Hioki T, Nakashima D, Yamaguchi S, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Iida H. Tramadol enhances PGF_{2α}-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Heliyon.* 2020;6(8):e04779.
- 3) Nakashima D, Onuma T, Tanabe K, Kito Y, Uematsu K, Mizutani D, Enomoto Y, Tsujimoto M, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Iida H. Synergistic effect of collagen and CXCL12 in the low doses on human platelet activation. *PLoS One.* 2020;15(10):e0241139.
- 4) Hioki T, Kawabata T, Sakai G, Fujita K, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kim W, Otsuka T, Iida H, Tokuda H, Kozawa O. Resveratrol suppresses insulin-like growth factor I-induced osteoblast migration: Attenuation of the p44/p42 MAP kinase pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2020;84(12):2428-2439.
- 5) Tachi J, Tokuda H, Onuma T, Yamaguchi S, Kim W, Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Kozawa O, Iida H. Duloxetine strengthens osteoblast activation by prostaglandin E₁: Upregulation of p38 MAP kinase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2020;151:106481.
- 6) Hioki T, Tokuda H, Nakashima D, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Kim W, Tachi J, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H, Kozawa O. HSP90 inhibitors strengthen extracellular ATP-stimulated synthesis of interleukin-6 in osteoblasts: Amplification of p38 MAP kinase. *Cell Biochem. Funct.* 2021;39(1):88-97.
- 7) Kuroyanagi G, Sakai G, Otsuka T, Yamamoto N, Fujita K, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. HSP22 (HSPB8) positively regulates PGF_{2α}-induced synthesis of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *J. Orthop. Surg. Res.* 2021;16(1):72.
- 8) Kim W, Tokuda H, Tanabe K, Yamaguchi S, Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Iida H. Acetaminophen reduces osteoprotegerin synthesis by PGE₂ and PGF_{2α} in osteoblasts: attenuation of SAPK/JNK but not p38 MAPK and p44/p42 MAPK. *Biomed. Res.* 2021;42(2):77-84.
- 9) Tachi J, Onuma T, Yamaguchi S, Kim W, Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Tokuda H, Kozawa O and Iida H. Duloxetine suppresses BMP-4-induced release of osteoprotegerin via inhibition of the SMAD signaling pathway in osteoblasts. *Biochem Cell Biol.* 2021. doi: 10.1139/bcb-2020-0347.

2. 学会発表

1) 徳田治彦、川端哲、新飯田俊平、小澤修。

ストレス蛋白質 (HSP)90 は骨芽細胞において血小板由来増殖因子 (PDGF-BB)により惹起される細胞遊走を促進的に制御する-p44/p42 mitogen-activated protein kinase(MAPK)経路の関与-。

第 62 回日本老年医学会学術集会、2020 年 8 月 4-6 日、誌上発表。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし